

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-515018

(P2001-515018A)

(43) 公表日 平成13年9月18日 (2001.9.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 25/28	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/28		43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
43/00	1 1 1	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2000-509293(P2000-509293)
 (86) (22) 出願日 平成10年8月12日 (1998.8.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年2月14日 (2000.2.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US 98/16794
 (87) 国際公開番号 WO 99/08533
 (87) 国際公開日 平成11年2月25日 (1999.2.25)
 (31) 優先権主張番号 60/055,268
 (32) 優先日 平成9年8月13日 (1997.8.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 エール ユニバーシティ
 アメリカ合衆国コネチカット州 06520-8336 ニュー ヘブン ホイットニー アベニュー 155, オフィス オブ コーパレティブ リサーチ
 (72) 発明者 ストリートマター, ステフェン エム
 アメリカ合衆国コネチカット州 06413 クリントン プレンザント ベリー ロード 28
 (74) 代理人 弁理士 斉藤 武彦 (外1名)
 Fターム(参考) 4B065 AA90X AA95X AC14 BA14 CA24 CA44 4C084 AA13 BA44 DC01 ZA021 ZC192 ZC422

(54) 【発明の名称】 中枢神経軸索再生

(57) 【要約】

急性又は慢性脊髄損傷外傷性脳損傷及び白質発作を含む種々の中枢神経系障害の治療用軸索再生促進する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 患者に有効量の少なくとも一つのr h o蛋白阻害剤を投与することからなる軸索再生を必要とする患者の中樞神経系の軸索成長を促進する方法。

【請求項2】 患者が、軸索又はかれらの非ニューロン性支持組織にr h o蛋白阻害剤を機械的に導入することにより治療される請求項1の方法。

【請求項3】 r h o蛋白阻害剤は、阻害剤を発現する複製不能のアデノウイルス、アデノ結合ウイルス又はヘルペスウイルスを患者に投与することにより導入される請求項1の方法。

【請求項4】 阻害剤がアデノウイルスで発現される請求項3の方法。

【請求項5】 阻害剤がアデノ結合ウイルスで発現される請求項3の方法。

【請求項6】 r h o蛋白阻害剤が、r h o、r a c、及びc d c 4 2阻害剤及びこれらの混合物からなる群から選ばれる請求項1-5の何れか一つの項の方法。

【請求項7】 阻害剤が、C . b o t u l i n u m C 3エキソ酵素である請求項1-5の何れか一つの項の方法。

【請求項8】 患者が、患者にキメラC . b o t u l i n u m C 2 / C 3阻害剤を投与することにより治療される請求項7の方法。

【請求項9】 患者が急性又は慢性の脊髄の損傷を受けた請求項1-5又は8の何れか一つの項の方法。

【請求項10】 患者が白質の発作にかかっている請求項1-5又は8の何れか一つの項の方法。

【請求項11】 患者が外傷性脳の損傷を受けた請求項1-5又は8の何れか一つの項の方法。

【請求項12】 製薬上許容される担体中のr h o蛋白阻害剤を含む中枢神経系の損傷の治療用の製薬組成物。

【請求項13】 C . b o t u l i n u m C 3エキソ酵素を含む請求項12の組成物。

【請求項14】 エキソ酵素が、複製不能のアデノウイルス、アデノ結合ウ

ィルス又はヘルペスウィルスにより発現される請求項13の組成物。

【請求項15】 エキソ酵素がアデノウィルスにより発現される請求項14の組成物。

【請求項16】 エキソ酵素がアデノ結合ウィルスにより発現される請求項14の組成物。

【請求項17】 キメラC2/C3 C. botulinumエキソ酵素構築物を含む請求項12の組成物。

【請求項18】 エキソ酵素構築物が、複製不能のアデノウィルス、アデノ結合ウィルス又はヘルペスウィルスにより発現される請求項17の組成物。

【請求項19】 化合物のrho蛋白阻害活性をアッセイすることを含む化合物の軸索再生活性の存在又は不存在をスクリーニングする方法。

【請求項20】 rho蛋白がrac1である請求項19の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

関連出願日

本出願は1997年8月13日に出願された米国特許出願第60/055,268号の優先権を主張するものである。

【0002】

発明の技術分野

本発明は成長コーンシグナル変換タンパク機能のしゅしょくを生ずるアデノウィルス媒介遺伝子治療を含む、中枢神経系軸索生成を促進する治療に関する。この治療方法は特に重大な慢性の脊柱索状組織の損傷外傷性の脳損傷及び白質発作からの回復に関する。

【0003】

脊柱の索状組織機能はこれらの細胞の延ばされた軸索過程を通して1つの神経細胞から他への電氣的条件を必要とする。成人の脊柱索状組織への損傷の後、これらの連結は中断され、そして残存する神経細胞は筋肉を管理し、感覚を供給するためお互いに情報伝達できなくなる。以前の研究は神経細胞は適当な環境が与えられた場合に、それらの軸索を延ばすことができることを示している。残念ながら、成人の脊柱索状組織は抑性分子が非神経単位の補助細胞によってしほり出されているので不適当な環境である。このように、その抑制の影響が克服されれば、軸索の再生及び機能回復は結果として生じるだろう。

【0004】

【従来の技術】

発明の背景

脊柱索状組織は、その中で多数の軸索が中断されている状態の模範的な例であるが、神経細胞体の大多数がそっくりそのまま残されている。大脳皮質中への皮質脊柱錐体神経細胞及び背部のルート神経節中の大きな神経繊維知覚神経は大量に現れるけれども、それらは、損傷した軸索を再生できない。慢性のまひ及び知覚まひは、軸索の再生し損なった結果である。ラキュナ (Lacunar) 白質

発作及び広がった外傷性脳損傷は軸索自体が損傷の主要な現場であるという意味において類似している。脊椎動物の系においては、中枢神経系（CNS）ではなくて、末梢神経（PNS）が損傷後軸索を再生する能力があることがよく知られている。坐骨の神経移植片の損傷したCNS組織への移植はCNS軸索が末梢神経を通して再生できることを証明している（David及びAguayo、1981年）。

【0005】

いくつかのCNSミエリン由来反発因子が確認されている。35kDa（NI-35）及び205kDaの抗原性に関連したSDS-PAGE後のリボソームに対する抑制活性が再構成された（Caroni及びSchwab、1988年）。NI-35は軸索の伸張を抑制し、成長コーン虚脱を誘発する（id及びBantlow他、1993年）、NI-35に対する抗体は脊柱索状組織のトランスセクションの後この抑制の生理学上の関連性を証明しながら、いくつかの軸索再生を促進する（Schnehl他、1994年）。脊柱索状組織損傷場所での嗅覚被覆（ensheathing）細胞の移植は、多分、通常抑制物質を生産する乏〔寡〕突起（神経）膠細胞の代わりをすることにより、ある程度の軸索再生を促進する（Li他、1997年；Imaizumi他、1998年；Mukhopadhyay他、1994年）。

【0006】

インビトロで、神経突起成長のCNSミエリン抑制もミエリン関連糖タンパク（MAG；Mukhopadhyay他、1994年；Mckerracher他、1994年）によってある程度媒介されている。インビーボにおいて、MAGは、軸索再生のミエリン抑制に寄与する又はそうでないかもしれない（Bartsh他、1995年；Schaffer他、1996年）。もし、軸索副産物に対するCNSミエリンの抑制効果がインビーボにおいて妨げらることができるなら、脊柱索状組織の外傷及び他のCNS軸索損傷の事例からの増加した回復も起こりそうである。胎生の神経細胞の成人のCNSミエリン索へのマイクロ移植に関する最近のデータは成人CNSミエリン内でのいくつかの軸索伸長を提供している（Davis他、1997年）。乏突起（神経）膠細胞成分はもちろん星状

細胞傷跡も成人のCNS軸索再生不能に寄与していることが含まれている。反発因子は主として成長する軸索の末梢部の先端で分化した成長コーンに作用すると考えられている (Strittmatter、1995年; Strittmatter、1996年)。

【0007】

神経細胞の成長コーンは神経系の発達及び再生の間無数の潜在的な経路及びターゲットを区別するために、知覚器官を有している (Strittmatter、1995)。細胞外でのシグナルは、成長コーンのアクチン基材細胞骨格での変化を誘発し、これ故に、その組織及び運動性を誘発する。細胞外のクルーが細胞骨格の再配置に変換される分子メカニズムが少し明らかにされた。

【0008】

セマフォリン (semaphorin) / コラプシン (collapsin) 属のタンパク質が、軸索生成及び末端の樹枝状分岐の重要な1つの陰性のレギュレーターとして認められている (Luo他、1993年; Kolodkin他、1992、1993年)。ヒナコラプシン-1 (chick collapsin-1) は、成長コーン虚脱そして少なくともDRG神経細胞の部分集合からは神経突起の生長の中断を誘発する (Raper及びKapfhammer、1990年; Luo他、1993年)。昆虫セマフォリン (insect semaphorin) は軸索の経路検索 (pathfinding) 及び対合的末端分岐 (synaptic terminal branching) 間に証明されたインビーボでの役割を有する (Kolodkin他、1992年; Matthes他、1995年)。少なくとも7つの脊椎動物セマフォリンが同定されており、20程度のこのファミリーの仲間があるかも知れない (Puschel他、1995年; Adams他、1996年)。コラプシン-1の適用後アクチンフィラメントの減少が提供されている (Fan他、1993年)。非同定トランスメンブラン受容体に結合しているコラプシン-1がこの解重合の引き金となっているメカニズムは明らかでない。

【0009】

非神経細胞において、rho亜科の単量体ras関連GTP結合タンパク質

は、アクチン基材細胞骨格及び細胞形状に顕著な効果を有する (Hall、1990、1994年)。繊維芽細胞において、rho活性化は張力繊維形成及び焦点接着 (focal adhesion) にリンクしており、rac1活性化はメンブランラフリング (membrane ruffling) に、そしてcdc42活性化は、糸状仮足 (filopodial) 形成にリンクしている (Nobes及びHall、1995年)。一つのアミノ酸置換がこれらのタンパク質の各々の構造的な活性又は負の優性形を引き起こす。ボツリヌス菌ADPリボシレートrho (C. botulinum ADP-ribosylates rho) からのC3転移酵素はGタンパク質を非活性化する。

【0010】

神経細胞成長コーン運動性のレギュレーションへの、このクラスのGタンパク質の寄与は現在研究されてきている。神経芽腫細胞においては、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 又はヘテロトリメリックGタンパク質共役受容体 (heterotrimeric G protein-coupled receptor) に結合したトロンビンは迅速な神経突起の収縮を誘発する (Jalink及びMoolenaar、1992年; Jalink他、1994年)。そのボツリヌス菌からのC3転移酵素はrho活性化がこれらの細胞における神経突起長のLPAレギュレーションを成立させることを示しながらLPAの作用を妨げることが示されている (Jalink他、1994年)。活性化されたrhoの下流部門でのターゲットは、ミオシンL鎖フォスホリアーゼとして同定されており (Kimura他、1996年) ミオシンL鎖キナーゼ阻害物質、KT5926はLPA誘発神経突起収縮を妨げる (Jalink他、1994年)。

【0011】

神経突起生長のレギュレーションにおけるrho関連小Gタンパク質 (rho-related small G protein) のための更なる証拠がこれらのタンパク質の、インビートでの活性化された又は負の優性形発現している研究から生じている。rac1活性の変性及びより少ないcdc42活性への変性は、ハエにおける多くの神経細胞からの軸索伸長における不能をもたらす (Luo他、1994年)。小脳のプルキニエ細胞中の構成的な活性rac1を発現

するマウスが樹皮状形態における変性を示した（Luo他、1996年）。

【0012】

抑制（反発）分子が軸索の末梢先端（成長コーン）に作用する分子メカニズムは、現在研究中である。ここに報告されている研究において、GPT結合rhoタンパク質が多数の分子による軸索反発作用に要求されることが見出された（Jin及びStrittmatter、1997年）。組織培養における軸索成長についてのCNSミエリンの抑制効果はrhoタンパク質の抑制によって妨げられる。

【0013】

発明の要約

本発明の目的は急性又は慢性脊髄損傷、外傷性脳損傷及び白質発作を含む種々の中枢神経系障害の治療用軸索（アクソン）再生促進するためにこれらの発見を利用することである。

これらの及び他の目的は本発明によって達成される。

【0014】

本発明はrho、rac、cdc42インヒビター又はこれらのいずれかの混合物の如き少なくとも1つのrhoタンパクインヒビターの有効量を患者に投与することによって軸索再生に必要な患者の中枢神経系軸索生成を促進する方法を提供する。rhoタンパクインヒビターは軸索又はこれらの非神経保護組織に化学的に導入され得るか、又はインヒビターを発現する複製-不十分なアデノ、アデノ結合ウイルス又はヘルペスウイルスを投与することによって導入し得る。一つの具体例では、このインヒビターはC. ボツリヌス菌C3外酵素、他の具体例では、キラメC. ボツリヌス菌C2/C3インヒビターがある。

【0015】

本発明は従って本明細書に記載した方法を用いることによって中枢神経系の治療用rhoタンパクインヒビターを含有する医薬組成物を提供する。又は、rhoインヒビター活性を検定することによって化合物のパネル中の軸索再生活性を検出するために使用し得るスクリーンを提供する。

【0016】

図面の記載

図1はコラブシン-1-誘発成長コーン虚脱がKT5926及びPTXによって減衰され得ることを図解する線状グラフである。(A)検定の2時間前、KT5926の指示濃度はDRGエクスプラント培養基に加えられた。KT5926の低濃度がファクター5によってコラブシン投与応答曲線を右へシフトした。KT5926はコラブシン-1の非存在下で成長コーンについて影響を示さなかった。4-6の個別の実験からの平均が示される。(B)チックDRGエクスプラント培養を500 ng/ml百日咳ホロトキシンの添加又は500 ng/mlのオリゴマーBサブフラクションの百日咳トキシンのもつ成長培養地中で3時間予備インキュベートした。次いで、成長コーンコラブスを組換コラブシン-1-His₆の所定の濃度の存在下で測定した。オリゴマーBフラクションが影響をもたなかったにもかかわらず、百日咳ホロトキシンは200 pMコラブシン-1で成長コーンコラブスを著しく増加した($p < 0.05$ スチューデントのt-テイルドtテスト)。SEMによる5つの実験の平均を図解した。

【0017】

図2はrhoサブファミリータンパクでこすられたDRGニューロン中の成長コーンコラブス及び神経突起を示す。(A)摩砕のために用いたタンパク調剤はSDS-PAGEによって別けられ、coomassieブルーで染色された。45、36、25及び21 kDa Mr基準の移動は右側に示される。(B)DRGニューロンをrhoファミリータンパクの5 mg/ml及びC3トランスフェラーゼの0.1 mg/mlで所定のタンパクでこすった。培養4時間後、成長コーンコラブスを200 pMコラブシン-His₆に20分間さらして(灰色バー)、又はさらさないで(固体バー)評価した。これらのデータは3-9別々の実験について平均+SEMである。星印でしゆしされた値は同一の条件下でのバッファー-摩砕細胞と著しく異なる($p < 0.05$ 、スチューデントのt-テイルドtテスト)。(C)DRGニューロンを所定のタンパクで摩砕し、Bに記載した如くコラブシン-1にさらした。アクチンをTRITC-ファロイジンでホルマリン固定細胞を染色することによって視覚化した。拡大は500倍。(D)DRGニューロンをrhoファミリータンパクの5 mg/ml及びC3ト

ランスフェラーゼの0.1 mg/mlで所定のタンパクで摩砕した。培養2時間後、ニューロンをさらに3時間0（固体バー）又は200 pM（灰色バー）にさらし、そして次いで細胞ごとに平均全神経突起生長を決定した（Goshima 他、1995）。データは3-9別々の実験について平均+SEMである。星印でしるした値は同一の条件下でバッファー摩砕細胞と著しく異なる（ $p < 0.05$ 、スチューデントのトゥーテイルドtテスト）。

【0018】

図3は成長コーン運動性のコラプシン-1におけるrac1を示す。DRGニューロンをバッファー又は所定のGタンパクの種々の濃度で摩砕した。成長コーンコラプスをコラプシン-His₆にさらしたまたはさらさないで図2の如く決定した。データは2-4の別々の実験について平均+SEMであった。（A）N17 racタンパクの種々の濃度で摩砕後の成長コーンコラプスを200 pMコラプシンにさらして（○）又はさらさないで（●）で決定した。（B）DRGニューロンを0又は2.5 mg/mlのN17 rac及び次の構成活性Gタンパクの0又は5 mg/mlで摩砕した。BはN17 rac、CはN17 rac+V14 rho、Dは17 rac+V12 rac、及びEはN17 rac+V12cdc42、そしてAはバッファーである。成長コーンコラプスを200 pMコラプシン-1の非存在下（固体バー）又は存在下（灰色バー）中で決定した。V12 racがコラプシン誘発成長コーンコラプスのN17 rac阻害を部分的に逆転することを注意すべきである。（C）バッファー（●）、構成的に活性なV12 rac（◇）又は優性負N17 rac（◆）による摩砕後、成長コーンコラプスが所定の濃度のコラプシンにさらされたDRGニューロンについて計量された。

【0019】

図4はDRGニューロンについてC3トランスフェラーゼを示す。DRGニューロンを図2に記載した如く摩砕し培養した。データは2-4の別々の実験について平均+SEMである。（A）C3トランスフェラーゼの所定の濃度がDRGニューロンの摩砕を通して存在した。200 pMコラプシン-1の存在下及び非存在下で成長コーンコラプスを図2における如く決定した。（B）バッファーによる摩砕後、4 µg/ml C3トランスフェラーゼ、5 mg/ml V14 rh

o、又は両タンパク、ニューロンを0（灰色バー）又は200 pM（固体バー）コラブシン-Hisにさらし、そして成長コーンコラプスを定量した。B（B及びC）において、Aはバッファーであり、BはC3であり、CはV14rhoであり、DはC3+V14rhoであり、EはC3+V12racであり、そしてEはC3+V12cdc42である。（C）Bにおける如く摩砕された細胞ごとに平均全神経突起生長を200 pMコラブシン-Hisの存在下（灰色バー）又は非存在下（固体バー）で培養した後に決定した。

【0020】

図5はC3のトランスフェラーゼの効果がN17racによってブロックされないことを示す。

DRGニューロンをバッファー、5 mg/mlのN17rac、0.1 mg/mlのC3トランスフェラーゼ又は両タンパクで摩砕した。データは3-5別々の実験についての平均+SEMであった。（A）ニューロンを4時間培養し、次いで成長コーンコラプスを20分間200 pMコラブシン-Hisにさらし（灰色バー）又はさらすことなく（固体バー）検定した。（B）所定のタンパクで摩砕したニューロンの細胞につき平均全神経突起生長を培養後4時間後に決定した。

【0021】

図6はミエリン又はLPAによる成長コーンコラプスがN17racによってブロックされないことを示す。DRGニューロンを図における如く所定のタンパクで摩砕した。データは3の別々の実験についての平均+SEMである。（A）ニューロンを4時間培養し、そして成長コーンコラプスをバッファー（固体バー）、又はCNSミエリン抽出物（5 µgタンパク/ml、灰色バー）に30分間さらした後に検定した。（B）培養2時間後、ニューロンをさらに2時間CNSミエリン抽出物の0タンパク/ml（固体バー）又は5 µgタンパク/ml（灰色バー）にさらした。細胞につき平均神経突起生長を4時間後に決定した。（C）ニューロンを4時間培養し、そして成長コーンコラプスをバッファー（固体バー）又はLPA（1 µM、灰色バー）に30分間さらした後に検定した。

【0022】

図7はDRG成長コーン機能の *rho*/*rac* についてのモデル図である。DRG成長コーンについての三つの状態が形態学的に外観、神経突起割合、*rho* 活性化状態及び *rac*1 活性によってクラス分けされる。

【0023】

図8はタウ-E G E P と共にC3細胞外酵素の発現のための主要要素を説明するアデノウイルス形質転換ベクターマップを図解的に説明する。多シストロン性メッセージがコードされている。コザック翻訳開始部及び停止配列中のC3細胞外酵素又は *rac*1 末端のコード配列はリボソーム再入部位及び第2コザック翻訳開始部分及びマーカートンパク用の配列で続く。マーカはGFPの増大した蛍光変異体を伴う軸索の標的用のタウタンパクのフラグメントからなる。

【0024】

図9は *rac*1 変異体のアデノウイルスに関する発現の免疫プロットである。COS-7細胞を野生型 *rac*1 (レーン1)、V12 *rac*1 (レーン2)、N17 *rac*1 (レーン3) 又は非 *rac*1 タンパク1 (レーン4) を発現する組換えアデノウイルスによって感染させた。感染後24時間の細胞分析は *rac*1 の低い内生的レベルが組換えアデノウイルス感染によって著しく増大されることを示す。

【0025】

図10はC3細胞外酵素のアデノウイルスに関する発現を示す。COS-7細胞をGFP (コントロール、トップパネル) 又はC3プラスGFP (ボトムパネル) を発現する組換えアデノウイルスで感染させた。感染後1日に、細胞を固定し、そしてアクチンフィラメントをロダミン-パロイジン染色によって視覚化した。C3-発現細胞の変化した構造が知られ得る。細胞の95%以上が培養中に感染された。

【0026】

図11はC3を発現する組換えアデノウイルスが神経突起生長のミエリン誘発阻害を提供することを示す。DRGニューロン培養をC3/GFPで感染させ、次いで4日間培養した。蛍光顕微鏡はニューロン表現型 (トップパネル) によって細胞中にマーカートンパクの発現を示す。細胞をトリプシン化し、そして添加な

しに、コラブシン-1又はCNSミエリンの抽出物と取り替えた。神経突起はこれらの阻害因子の添加によって減少しないことに注意すべきである（ボトムパネル）。コントロール培養では、コラブシン及びCNSミエリンが約60%まで減少した。

【0027】

図12はラットの大脳皮質中のC3組換えアデノウィルスからの発現を示す。C3/E GFP アデノウィルスを8週年令のラットの大脳皮質に注入した。数日後に、ラットを殺し、脳を蛍光顕微鏡で試験した。大脳皮質中の注入部位での非常に濃い細胞E GFP 蛍光を注目する。類似の結果が4週間まで数回得られている。類似の発現がまた局所注入後にDRGで得られる。

【0028】

発明の詳細な記載

本発明はr h oタンパク阻害が損傷した脊髄又は脳の機能回復を妨害する分子の作用をブロックすることによって中枢神経損傷後に軸索再生を促進することを発見したことに基づくものである。

本発明の1つの観点によれば、急性又は慢性の脊髄損傷、外傷性脳損傷、白質発作、又は軸索を損傷した及び軸索路を崩壊した他の中枢神経系損傷等の治療に必要な患者に少なくとも1つのr h oタンパク阻害剤の有効量を投与することによって軸索が増大され且つ成長が促進される。「r h oタンパク阻害剤」はレセプターと結合するr h oタンパク機能をもつ全ての阻害剤、類似体、タンパク又はタンパクフラグメントに対する抗体等の全ての阻害剤を意味する。阻害剤の混合物もまた使用でき、同様にr h oタンパク合成又は安定剤の阻害剤も使用できる。ここで使用される「患者」は動物及びヒトの両者を含む。本発明は医薬及び動物薬の適用の両者に有用である。

患者は少なくとも1つの阻害剤を局所的に又は全身的に投与することによって治療し得る。全身的投与は当業者に周知の方法、例えばロゼンジン、錠剤、カプセル、顆粒、又は他の食用組成物の経口投与；皮下、筋肉内、静脈内、又は皮内投与、例えば滅菌注射；流体等の非経口投与によって投与される。典型的な全身投与は製薬的許容し得る担体に分散した又は溶解した阻害剤の使用を包含する。

【0029】

局所的に投与する場合、少なくとも1つの阻害剤が軸索に又はこれらの非神経保護組織中に導入される。阻害剤の局所投与は、しかしこれに限定されないが、注入のような任意の手段を用いることによって阻害剤の機械的導入を包含する、例えば、製薬的に許容し得る担体に、そしてしばしば浸透及び吸収及び／又は阻害活性を増大させる成分と組合せて、阻害剤を含有する組成物を組織に灌流又は注入することによって、そして組換えウィルス発現阻害剤の注入によって投与することを包含する。

【0030】

最後の方法は実施例2において下記に説明される。この方法では、*rho*タンパクを阻害するC₃ボツリヌス菌C₃インヒビターがこのC₃を発現する複製不完全なアデノウィルス、アデノ関連ウィルス又はヘルペスウィルスを用いることによって患者に静脈内に導入される。組換えアデノウィルスは、例えば、CNS中で制限された免疫学的反応によって数週間又は数カ月かけて外来遺伝子のニューロン発現に向けるために利用されている（Chio-Lumderg他、1997）。アデノ関連ウィルスはこれらの低い毒性及び長期のタンパク発現の故にいくつかの態様で使用される。

C₃インヒビターの代わりは細胞表面を用いてボツリヌス菌C₂毒素から成分を結合させることによって最近開発されたC₃外酵素の組換え2成分供給系である（Barth他、1998）。アクチン活性はC₂毒素から除去され、C₃酵素活性が置換された。このC₃キメラタンパクはC₃外酵素それ自体よりも少なくとも100倍効率的に非ニューロン細胞にすることが報告されている。この態様の使用は神経系への分子の直接注入を包含することができ、ウィルス注入の潜在性の非特異的効果なしに*rho*阻害を達成できる。

【0031】

治療処理を実施するために必要なインヒビターの量はそれ自体固定されないけれども、製薬担体、阻害作用及び／又は浸透を増大させるために投与される組成物中の添加物と組合せて投与される組成物中の成分の濃度に必然的に依存する。好ましい組成物は患者に許容し得ない毒性を生ずることなく阻害剤の有効を供給

する。浸透及び吸収増強剤及び／又は阻害活性増強剤に加えて、本発明の医薬組成物又は製剤は他の担体、助剤、安定剤、保存薬、分散剤、及び論議されている製剤の型に関する技術分野においての通常の薬剤を含有し得る。

本発明は軸索再生を刺激し且つ種々の中枢神経系損傷の対応する治療方法及び種々の治療に使用する医薬組成物を提供すると共に r h o タパク阻害活性用の検定に使用し得るスクリーンを提供する。本発明のこの観点において、種々の生物学的物質を包含する天然又は合成化合物のパネルは r a c 1 阻害のような r h o たんぱく阻害検定を用いて軸索再生治療における潜在性のためにスクリーンされる。スクリーンテストは定量又は定性であり得る。典型的な方法はテスト化合物のパネルによって観察された阻害をコントロール、例えば C ボツリヌス菌 C 3 外酵素、阻害と比較することによって行われる。阻害の存在は軸索再生の刺激のためのポテンシャル薬剤を示す。スクリーンで同定されたインヒビターは次いでさらにテストされ、局所及び／又は全身投与のいずれかで有効性について特にテストされる。

【0032】

【実施例】

下記の実施例は本発明をさらに説明するために記載するものであり、いかなる意味においても限定するものとして考慮されるべきではない。

【0033】

実施例 1

この実施例は r a c 1 がコラプシン-1-誘発成長コーンコラプスを媒介する証拠を提供する。主として、コラプシン-1/セマホリン III (D) はニューロン成長コーンラメリポリアル及びフィロポリアル構造を崩壊することによって軸索生長を阻害する。成長コーンコラプスはアクチン脱重合と関連されるので、r h o サブファミリーの小さな G T P-結合タンパクをコラプシン-1 シグナル形質導入におけるその関与を研究した。組換え r h o、r a c 1 及び c d c 4 2 タンパクを胚チック D R G ニューロン中に摩擦した。構造的に活性な r a c 1 は崩壊した成長コーンの割合を増加する、そして優性ネガティブ r a c 1 はコラプシン-1-誘発成長コラプス及びコラプシン-1 阻害神経突起生長を阻害する。

優性ネガティブ *rac1* で処理された DRG はミエリン誘発生長コーンコラプスに感受性である。*cdc42* の類似変異体はコーン構造、神経突起伸長又はコラプシン感受性を変化しない。活性化 *rho* の添加は影響をもたないのに対してボツリヌス菌 C3 トランスフェラーゼをもつ *rho* の阻害は DRG 神経突起の生長を刺激する。C3-処理成長コーンはラメリポジアルスプリーディングをほとんど又は全く阻害しないし、コラプシン-1 及びミエリンに対してわずかに感受的である。これらのデータは成長コーン運動性を調整において *rho* 及び *rac1* について顕著な役割を示し、そして *rac1* がコラプシン-1 作用を媒介することを示す。

【0034】

物質及び方法

タンパクの調整；Gタンパク、コラプシン、ミエリン、モノメリックヒトGタンパク及びボツリヌスC3トランスフェラーゼをGST融合タンパクとしてバクテリア中に作り、次いでトロンピンで処理してGST部分を除去した(Nobes and Hall, 1995)。トロンピンをp-アミノベンズアミジン-アガロースに吸収させてサンプルから除いた。次の誘導体を作った。野生型 *rhoA* (*rho*)、*Val* (*V14rho*) に変性された位置14で *Gly* をもつ構造的に活性な型の *rhoA*、野生型 *rac1* (*rac*)、*Val* (*V12rac*) に変性された位置12に *Gly* をもつ構造的に活性型の *rac1*、*Asn* (*N17rac*) に変性された位置17に *thr* をもつ *rac1* の優性ネガティブ型、野生型の *cdc42* (*cdc42*)、*Val* (*V12cdc42*) に変性された位置12に *Gly* をもつ *cdc42* の構造的に活性型、*Asn* (*N17cdc42*) に変性された位置17に *Thr* をもつ *cdc42* の優先ネガティブ型、及びC. ボツリヌス (C3) からのC3外酵素。*rho* 及び *V14rho* タンパクはE. コリー中で安定性を増すために *Phe* の位置25で *Asn* の置換を含有する。

【0035】

コラプシン-His₆ は先に記載した如く調整される (Goshima 他、1995)。ミエリンフラクションはウシ脳から調整され、そして2%オクチルグ

リコシドによって抽出されたタンパクを透析によって洗浄剤の除去後に成長コーンコラプス中でテストされた (Igarashi 他、1992)。

【0036】

DRG培養条件及び摩砕方法。チックE7DRGエキスプラントの調整及び解離したニューロン培養は先に記載されている (Strittmatter 他、1994a; Goshima 他、1995)。摩砕実験について、ニューロンは5 mg/ml rhosubfamilyタンパク又は0.1 mg/ml C3トランスフェラーゼをもつ、25 mMのトリス-HCl、150 mMのNaCl、5 mMのMgCl₂、1 mMのDTTのpH 7.5中に懸濁し、次いでギルソンP200ピペット先端を介して50回通過させた (Strittmatter 他、1994a; Goshima 他、1995)。摩砕後にニューロンを100 µl/ml ポリ-L-リジン及び20 µl/ml ラミンで連続的に予備被覆したガラス表面上に10% FBS及び50 ng/ml 7S-NGFによって25容量のF12中に培養した。LPAによる実験について、摩砕されたニューロンを血清を含まない媒質 (1% 脂肪酸を含まないBSA及び50 ng/ml 7S-NGF) に成長コーンコラプス検定前に3時間の間に移した。

【0037】

神経突起生長及び成長コーンコラプス。生長検定について、摩砕した細胞を1.5～2時間培養し、次いで処理されるべき薬剤を媒質に加えた。インキュベーションのさらなる2～3時間後に細胞を固定し、ニューロンにつき全神経突起を75～150細胞について測定した (Strittmatter 他、1994a; Goshima 他、1995)。エキスプラント培養についての成長コーンコラプス検定は詳細に記載される (Paper 及びKapfhammer、1990; Strittmatter 他、1994a; Goshima 他、1995)。摩砕細胞について、ニューロンを20～30分間テスト化合物に添加する前に4時間培養した。崩壊した成長コーンのフラクションを培養に関して評点した。

免疫組織学。解離したチックE7DGRニューロンを24時間培養し、次いで30分間PBS中でアイス冷却4%パラホルムアルデヒド、20%サッカロース

で固定した。サンプルを次いでヒト *rac1* を攻撃する $4\mu\text{g/ml}$ 抗-*rac1* マウスモノクローナル抗体でインキュベートした (Upstate Biotechnology)。ある場合には、*rac1* タンパクの 1mg/ml を染色の特異性を示すために抗体をもつインキュベーションに加えた。結合した抗体をホースラディッシュペルオキシダーゼ酵素及びジアミノベンジジン基質 (Goshima 他、1995) によってアビジン-ビオチン複合体方法 (Vector Laboratories) で検出した。第1抗体溶液に対する (mg/ml 組換え *rac1* タンパクの添加が全て染色を完全に破壊した。成長コーンはまた微分干渉対比観測によって検出し得た。

【0038】

[結果]

[コラプシン-1作用とLPA及びトロロニン作用との比較]

コラプシン作用における小G蛋白の割合を評価する第一の段階として、コラプシン-1作用に対する容易に利用できる薬理学的剤の効果を、LPA及びトロロニン作用に対するそれらの作用に比較した。ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤KT5926は、LPA誘導ニューライト収縮を阻止し、そしてまた成長円錐崩壊因子として組み換えコラプシン-1の能力を低下させる (図1A)。多数の他の剤は、チロシンキナーゼ阻害剤、蛋白キナーゼA阻害剤、電圧感受性Caチャンネルブロッカーを含むコラプシン-1作用及びKC1との脱分極に対して殆ど又は全く作用しない。さらに一般的な蛋白キナーゼ阻害剤スタウロsporin及び蛋白キナーゼC活性化剤TPAは、ともに10nMより低い濃度で成長円錐崩壊を誘導したが、それらの作用はコラプシン-1と相乗的ではなかった。

【0039】

LPA及びトロロニンの作用は、ヘテロトリマー性G蛋白に結合する受容体により媒介される (Jalinkら、1994)。組み換えコラプシン-1作用がまたトリマー性G蛋白活性化を含むかどうかを考察した。百日咳毒素 (PTX) は、Go α クラスのヘテロトリマー性G蛋白のサブユニットをADP-リボシル化し、そして受容体によりそれらの活性化を阻止する。粗全脳膜抽出物 (コラプシン-1を含むBME) による成長円錐崩壊は、PTXによりブロックされる

が (Igarashiら、1992)、しかしこれは、G蛋白のその修飾よりむしろPTXの細胞表面結合性による (Kindt及びLander、1995)。PTXの単離されたオリゴマーBフラクションは、細胞表面結合ドメインを含むが、精製された組み換えコラプシン-1誘導成長円錐崩壊をブロックしない (図1B)。従って、未処理PTXによるコラプシン-1能力の低下は、コラプシン作用がヘテロトリマー性G蛋白を含むことを示唆し、LPA及びトロピン作用との類似を強調する。高いコラプシン-1濃度におけるPTX遮断の失敗は、PTX不感受性G蛋白又は非G蛋白依存機構の何れにも帰することができる。BME作用のオリゴマーB遮断は、粗抽出物におけるコラプシン-1以外の崩壊剤の阻害を反映している。

【0040】

[外因性rhoサブファミリー蛋白を含むDRGニューロンにおける基底的な発芽後成長]

DRGニューロンのrhoサブファミリーG蛋白の活性を調整するために、精製した組み換え蛋白は、単離されたニューロンにより粉碎 (trituration) された。ニューロンは、粉碎直後平板培養され、ニューライト拡張をし、そして成長円錐形態を2-5時間後観察した (図2)。全ての粉碎された蛋白は、95%以上の純度を有した (図2A)。平板培養4時間後、バッファーにより粉碎されたニューロンは、粉碎されなかった細胞との区別されない。組み換え蛋白はどれも、これらの条件下でラミニン被覆表面に付着するニューロンの数に影響しない。rho活性を改変する蛋白では、C3トランスフェラーゼのみが発芽後成長を改変した。ニューライト拡張は、C3トランスフェラーゼ処理を2倍にし (図2D)、そして殆ど全ての成長円錐は、非常に減少したラメリボジウム性広がりを示す (図2B、C)。これらのデータは、基底的な条件下ではrhoの顕著なフラクションは活性化されそうであるとの可能性が生ずる。rac1蛋白では、構成的に活性な形は、崩壊した外観を有する成長円錐の%を増加させ (図2B、C) そして統計的に有意に達しない低下したニューライト拡張に向かう僅かな傾向が存在する (図2D)。これらの弱いV12rac作用は、コラプシン-1の作用に良く似ている。同じ濃度でのcdc42蛋白は、成長円錐の外

観又はニューライト拡張を改変しない。

【0041】

[rhoサブファミリー蛋白を含むDRGニューロンにおけるコラプシン-1感度]

rhoファミリーメンバーにより粉碎されたニューロンは、コラプシン-1に曝され、次に成長円錐の形態及びニューライト拡張を調べた。コントロールの培養では、30分間コラプシン-1への曝露は、15%から70%へ崩壊した成長円錐の%を増加させる(図2B、C)。平板培養後2-5時間の間隔中のコラプシン-1の曝露は、50%発芽後成長の程度を低下させる(図2D)。成長円錐崩壊及びニューライト発芽後成長におけるコラプシン-1誘導の変化は、優性ネガティブN17racにより処理されたニューロンにおいて顕著に減衰される

(図2B-D)。対照的に、構成的に活性なV12rac処理及び野生型rac処理の範囲は、コラプシン-1に対して本質的に正常な応答を示す。cdc42蛋白又はバッファーによる粉碎は、コラプシン-1感度を改変しない。同様に、野生型及び活性化されたrhoは、コラプシン-1作用を改変しなかった。しかし、増大したニューライト発芽後成長を示すC3トランスフェラーゼ処理ニューロンは、コラプシン-1の阻害作用に最低の感受性を有する(図2D)。C3処理培養における成長円錐の低下したラメリポジウム性形態は、コラプシン-1により僅かに増大している(図2B、C)。

【0042】

[DRGニューロンにおけるrac1作用の特徴]

優性ネガティブN17rac粉碎の作用は、粉碎中存在するrac蛋白の投与量に依存し、1mLあたりの1mgより多い濃度の蛋白が、コラプシン-1誘導成長円錐崩壊の50%より大きい阻害を達成するのに要求される(図3A)。内因性rac1経路に関するN17rac作用の特異性は、優性ネガティブN17cdc42の不活性により示唆される(図2B、D)。さらに、構成的に活性なV14rho又はV12cdc42ではない、構成的に活性なV12racの共粉碎は、コラプシン-1誘導成長円錐崩壊のN17rac阻害を部分的に逆転する(図3B)。

【0043】

優性ネガティブN17racによる粉碎後、DRG成長円錐崩壊に関するコラプシン-1用量反応曲線は、15のファクターで右にシフトする（EC50、60pM-2nM、図3C）。N17rac粉碎細胞の成長円錐崩壊因子としてのコラプシン-1の残存する弱い作用は、粉碎法により達成される不完全なrac1遮断により、又は非rac1依存コラプシン-1誘導成長円錐崩壊機構によるものであろう。上記のように、構成的に活性なV12racによる粉碎は、成長円錐の20%の崩壊を誘導する（図2B）。コラプシン-1誘導成長円錐崩壊に関する用量反応曲線は、構成的に活性なV12racによる粉碎後2のファクターで左にシフトする（EC50、60pM-30pM、図3C）。

【0044】

もしrac1がコラプシン-1誘導成長円錐崩壊の内因性モジュレータであるならば、それは成長円錐に存在しなければならない。rac1の組織学的染色は、蛋白が成長円錐に見いだされそして成長円錐のその尖端でフィロポジウムの構造で存在することを立証する。そのため、蛋白はコラプシン-1作用を仲介する位置にある。

【0045】

[DRGニューロンにおけるC3作用]

神経芽細胞腫細胞を含む哺乳動物の細胞においてrhoを特異的にADP-リボシル化するC3エキソ酵素の能力は、すでに立証されている（Jalinkら、1994）。DRGニューロンにおけるC3トランスフェラーゼの作用は、粉碎中に存在するC3エキソ酵素の投与量に依存し、約1μg/mLでもDRG成長円錐の50%以上を崩壊させる（図4A）。構成的に活性なV14rhoは、基底成長円錐崩壊又は発芽後成長を改変しないが（図2B、D）、この蛋白による粉碎は、発芽後成長及び崩壊に対するC3作用を逆転する（図4B、C）。構成的に活性なV12rac又はV12cdc42の何れも、C3トランスフェラーゼの作用を逆転しない。一緒にして、これらのデータは、DRGニューロン中への粉碎後、rho阻害に対するC3トランスフェラーゼの特異性を支持する。

【0046】

[優性ネガティブ *rac1* は *rho* 不活性化の作用を遮断しない]

C3トランスフェラーゼ処理により生ずる成長円錐領域の低下は、増大したニューライト拡張を伴うが、コラブシン-1により生ずるそれは、低下した拡張を伴う。優性ネガティブ *rac1* が、それがコラブシン-1作用を遮断するように、C3トランスフェラーゼによる *rho* 阻害の作用を遮断できるかどうかと考えられた。C3トランスフェラーゼ及びN17 *rac* がともに粉碎されるとき、DRGニューライトはC3粉碎ニューライトに似ている(図5)。そのため、*rho* によるニューライト拡張のモジュレーションは、*rac1* により主として仲介されない。*rho* は、成長円錐の形態及びニューライト拡張を調節するために、別の経路の一つ以上及び/又は *rac1* の機能の下流で作用するだろう。

【0047】

[ミエリンの阻害作用は *rho* ファミリーメンバーにより仲介されない]

CNSミエリンの成分は、ニューライト再生に対する阻害的な影響を有しそしてコラブシン-1と同様なやり方で培養されたDRGニューロンの形態を改変する(Bandtlowら、1993)。CNSミエリン抽出物への曝露後の成長円錐崩壊は、N17 *rac* による粉碎により改変されない(図6A、B)。これは、ミエリンの阻害成分により利用される Ca^{+2} 依存経路(Bandtlowら、1993)が、コラブシン-1により利用される *rac1* 依存経路から区別されることを示す。C3処理培養に存在する急速に成長する小さい成長円錐は、ミエリンに対して不感受性である(図6A、B)。リソホスファチジン酸(LPA)は、DRG成長円錐の小さいフラクシオンの崩壊を誘導する(図6C)。このフラクシオンは、N17 *rac* により改変されず、LPA誘導崩壊はコラブシン-1誘導崩壊とは異なる経路を経て進むことを意味する。

【0048】

[討論]

[*rac1* はコラブシン-1作用を仲介する]

この研究からのデータのいくつかのラインは、*rac1* はDRGニューロンにおけるコラブシン-1作用を仲介するという仮説を支持している。優性ネガティ

ブN17racの粉碎は、コラプシン-1による成長円錐崩壊を殆ど完全に破壊し、そしてコラプシン-1によるニューライト発芽後成長阻害を極めて低下させる。他のrhoサブファミリーメンバーは、これらの作用を有しない。成長円錐中のrac1の存在は、コラプシン-1シグナルの役割と一致する。構成的に活性なV12racは、コラプシン-1作用と僅かに似ている。少ない度合いのV12rac作用は、(1)コラプシン-1誘導崩壊における非rac1依存機構の寄与、(2)粉碎法の非能率、又は(3)粉碎後3-5時間中に生ずる脱感作機構によるだろう。コラプシン-1作用はN17racにより阻害されるが、同じ形態的変化を誘導する他の細胞外蛋白の作用は、N17racによる粉碎により遮断される。これは、rac1がコラプシン-1作用に特異的に含まれそしてCNSミエリンの成分により誘導されるCa⁺⁺仲介成長円錐崩壊がこのモノマー性G蛋白を利用しないことを示す。

【0049】

[rhoはニューライト発芽後成長を調節するが、コラプシン-1により改変されない]

C3トランスフェラーゼによるrhoの阻害は、またDRGニューロンの形態を改変する。これは、基底条件下でDRG成長円錐の顕著なレベルのrho活性化を意味する。さらに、データは、rho活性化が発芽後成長を低下させるが、より大きな成長円錐の広がりをも導くことを示唆する。rho活性を低下させるための低投与量のC3により処理されたDRGニューロンでは、構成的に活性なV14rhoは、成長円錐の広がりを増大させ、そしてニューライトの発芽後成長を低下させる。低下した成長円錐の広がり及びrho阻害ニューロンの増大した発芽後成長速度は、コラプシン-1により最低でモジュレートされる。これらの作用は、rho作用をrac1活性化及びコラプシン-1添加から区別する。rhoはrac1及びコラプシン-1とは異なる作用を働くようであるが、成長円錐の形態及び運動性は、添加rho及びrac調節を反映できる。rho活性化は3T3繊維芽細胞におけるrac1活性化の下流であるが(Nobes及びHall、1995)、これはDRG成長円錐におけることではないように思われる。rhoは、コラプシン-1作用の主なメディエータであるように思われない。

が、それは、LPA及びトロンビンについて示唆されているように、他のDRG成長円錐調節剤に関する目標であろう(Jalinkら、1994)。ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤KT5926は、rhoによるミオシン軽鎖ホスホリラーゼ調節を妨げるだろう(Kimuraら、1996)。そうすることにおいて、この化合物は、C3トランスフェラーゼ作用を部分的に再生し、そしてコラプシン-1感度を低下させる。

【0050】

[rho/rac1活性化とDRG成長円錐運動性の三つの状態と相関性]

現在の研究は、培養では、DRG成長円錐に関する3種の交互の状態を同定する(図7)。基底条件下で、成長円錐は広がりそして中程度の速度で進む。コラプシン-1は、発芽後成長の速度を遅くし、そして成長円錐のラメリボジウム及びフィロポジアを崩壊する。成長円錐の行動におけるコラプシン-1誘導改変は、rac1活性化により仲介され、そして優性ネガティブN17racの存在により平滑化される。対照的に、C3トランスフェラーゼによるrho機能の阻害は、発芽後成長速度を増加させるが、一方成長円錐領域を減少させる。基底状態は、rho活性化及びrac1不活性と相関しているように思われる。

【0051】

[rac1活性化の機構：db1蛋白、G蛋白カスケード、CRMP]

rac1が細胞外コラプシン-1により活性化されるかも知れない機構は、不明である。他の細胞タイプでは、ヒトDb1に相同的なドメインを有する蛋白は、グアニンヌクレオチド交換因子としてrac1の上流で作用するが(Boguski及びMcCormick、1993)、ニューロン成長円錐におけるそれらの存在は、研究されていない。いくつかのクラスの受容体は、他の細胞でrac1を活性化できると思われ、受容体チロシンキナーゼ、ヘテロトリマー性G蛋白にカップリングしたセルペンチン受容体及びTNFクラスのサイトカイン受容体を含む。成長円錐シグナルトランスダクションにおけるヘテロトリマー性G蛋白の中心的な役割は、多数の研究により支持されている(Strittmatterら、1990; 1993; 1994b; 1995)。そこに提示されるデータは、ヘテロトリマー性G蛋白(図1B)がコラプシンシグナル化に含まれる

であろうことを指示している。ニューロン性蛋白の細胞内ファミリーCRMPは、同定されており、これらはコラプシン作用を要するが、このシグナル化経路の他のメンバーとのそれらの相互作用は、確立されていない（Goshimaら、1995；Wang及びStrittmatter、1996）。細胞内カルシウムイオンレベルがコラプシン作用を仲介しているように思われることを示すデータは存在しない。

【0052】

[DRGニューロン中のrac1エフェクター]

rac1は、非ニューロン性細胞のアクチンに基づく細胞骨格を再組織でき、そして多数の蛋白キナーゼを活性化できる（Nobes及びHall、1995；Hall、1994；Coscoら、1995；Mindenら、1995）。細胞の形状におけるコラプシン-1誘導変化は、蛋白キナーゼ例えばPAKにより仲介できる（Manserら、1994）。rac1による活性化後、これらのキナーゼを、細胞骨格の機能を調節するように仮説を立てる。

【0053】

実施例 2

この実施例は、rho蛋白阻害に使用される組み換えC3アデノウィルスの発現及び生物学的活性、そしてニューロン性rho蛋白活性の生体内モジュレーションを報告する。

上記のように、C. botulinumからのC3エキソ酵素は、rhoを特異的にADP-リボシレートし、そしてこのG蛋白を不活性化する。ニューロン性成長円錐運動性の調節へのこのクラスのG蛋白の寄与は、最近になってはじめて検討されている。神経芽細胞腫細胞において、リソホスファチジン酸は、GPCRを経て急速なニューライト収縮を誘導する（Jalinkら、1994）。C. botulinumからのC3エキソ酵素は、LPAの作用を遮断することが示され、rho活性化がこれらの細胞のニューライトの長さのLAP調節を仲介することを指示する（Jalinkら、1994）。神経芽細胞腫細胞中へのrhoファミリー蛋白の注入は、実際に、成長円錐の形態及び軸索の発芽後成長を改変する（Kozmaら、1997）。ニューライト発芽後成長の調節におけ

る *rho* 関連小 G 蛋白のさらなる証拠は、生体内のこれらの蛋白の活性化された又は優性ネガティブの形を発現する研究から得られる。構成的に活性な又は優性ネガティブ突然変異体の発現による *rac* 活性の改変は、ハエにおける多くのニューロンからの軸索拡張で失敗する (Luo ら、1994)。小脳 Purkinje 細胞における構成的に活性な *rac1* を発現するマウスは、樹状の形態における改変を示す (Luo ら、1996)。

組み換え *rho*、*rac1* 及び *cdc42* 蛋白は、粉碎されて実施例 1 の胚性ヒヨコ DRG ニューロン中に入れた。原型性の拡散可能な軸索リペレントであるコラブシン-1 (セルナホリン D / III) への軸索の応答を調べた。構成的に活性な *rac1* は崩壊した成長円錐の割合を増大させ、そして優性ネガティブ *rac1* は、コラブシン誘導成長円錐の崩壊及びニューライトの発芽後成長のコラブシン阻害を遮断する。優性ネガティブ *rac1* により処理された DRG ニューロンは、ミエリン誘導成長円錐崩壊に感受性を有したままである。*cdc42* の同様な突然変異体は、成長円錐構造、ニューライト伸長又はコラブシン感度を改変しない。活性化された *rho* の添加は効果を有しないが、*botulinum*

C3 エキソ酵素による *rho* の阻害は、DRG ニューライトの発芽後成長を促進する。

【0054】

ニューライトの発芽後成長は、*rho* 阻害後 150% のコントロールレベルに増加し、成長円錐のサイズは減少する。C3 処理成長円錐は、殆ど又は全くラメリボジウムの広がりを示さず、そしてコラブシン又は LPA に非感受性である。CNS ミエリン抽出物はコントロールニューロンから発芽後成長を 50% 減少させるが、この阻害性抽出物は、C3 処理培養から発芽後成長を低下させない。

実施例 1 の培養の研究では、精製された蛋白は、機械的な手段によりニューロン中に入れられる。それは、ニューロンに入らず又は個々の細胞の粉碎なしに *rho* を ADP リボシレートしない。酵素を伝達するために、C3 蛋白を発現する組み換えアデノー及びヘルペスウィルスが由来された。これらのベクターは、緑蛍光蛋白の増強した蛍光物 (EGFP、Clontech) とともに C3 を発現する。これらのベクターは、2 週間 (HSV、Carlezon ら、1997)

から2月間（アデノ、Choi-Lumdburgら、1997）、有害な作用なしにニューロン中の他の外来蛋白の発現をさせた。アデノウイルスは、E1及びE3欠損であり、それらは複製不能である（Heら、1998）。ヘルペスウイルスの調製品は、アンプリコン系を利用し、C3及びEGFP配列はHSVの即時型プロモータ4/5及びHSVパッケージ部位を含むプラスミド中に挿入された。組み換えウイルス調整品は、アンプリコンプラスミドによる配列トランスフェクション及びHSVの即時型遺伝2欠損突然変異体による感染後、パッケージ細胞系から得られる（Neveら、1997）。

【0055】

問題の蛋白の発現カセットは、アデノウイルスの主な後期プロモータにより駆動される発現により、トランスファーベクターpQB1-AdBM5で構築された（図8；Massieら、1995）。線状のトランスファーベクターは、HEK293細胞中にC1aI-切断E1/E3欠損ウイルス性DNAの長鎖と共トランスフェクトされた。ウイルスは複製不能であるが、ウイルス粒子は、それらが安定にトランスフェクトされて、複製不能のウイルスから失われているE1蛋白要素を発現するため、これらの細胞で増幅できる。ウイルスストックは、2回ブランク精製され、塩化セシウム平衡遠心分離により増やされ、そして滴定された。

【0056】

これらのウイルスストックは、COS-7腎細胞を感染するのに利用された。感染24時間以内に、95%以上の細胞が、生細胞の輝緑色の蛍光により判断されるように、GFPマーカー蛋白を発現する。rac1蛋白の発現は、免疫プロット分析により立証された（図9）。C3エキソ酵素の発現は、ウイルス感染細胞のアクチン繊維染色における変化を観察することにより、間接的にドキュメントされた（図10）。C3発現COS細胞は、コントロール培養に見られるラメリボジウムの広がりなしに拡張的突起を示す。

【0057】

C3ウイルスは、培養中のDRG求心性ニューロンにおけるrho機能をモジュレートするのに使用された。10-100のMOI（感染多重度）のウイルス

感染5日後、DRG培養中の本質的の全てのニューロン及び非ニューロン性細胞は、GFPマーカー蛋白を発現する(図11)。C3エキソ酵素発現ウイルスにより感染された細胞からニューライトの発芽後成長は、阻害性因子コラプシン-1及びCNSミエリンに非感受性である(図11)。

【0058】

C3発現ウイルスは、皮質脊髄ピラミッドニューロンを感染する目的で、8週令のオスラットの大脳皮質中に注入された。注入1週後、大多数の細胞はGFPマーカーを発現する(図12)。

【0059】

結果は、C3ウイルスが、培養中の求心性ニューロンを感染せず、EGFPの直接的発現をせず、ニューロンをsernD及びCNSミエリンに不感受性にすることを示す。成熟ラットの大脳皮質又はDRG中へのアデノウイルスの注入が、少なくとも3週間EGFPマーカーを発現させることは明らかである。予備的研究では、Nissl染色調製品では、ウイルス注入に伴う主な細胞の毒性は存在しない。

【0060】

上述は、当業者に本発明をいかに実施するかを教示する目的であり、そして記述を読んで当業者に明らかになるその明白な変形及び変化のすべてをつくすことを目的としていない。しかし、全てのこれらの明白な変形及び変化が、以下の請求の範囲に規定される本発明の範囲内に含まれることを目的とする。請求の範囲は、記述が逆なことを特に指示していない限り、目的とする目標に合致するのに有効な任意の配列の工程及び請求の範囲のコンポーネントをカバーすることを目的とする。

【0061】

Adams RH, Betz H, Puschel AW (1996) Mech Dev. 57: 33-45.

Bandtlow CE, Schmidt MF, Hassinger TD, Schwab ME, Kater SB (1993) Science 259: 80-83.

Barth H, Hoffman F, Olenik C, Just I, Aktories K (1998) Infect Immun 66: 1364-1369.

Bartsch U, Bandtlow CE, Schnell L, Bartsch S, Spillmann AA, Rubin B P, Hillenbrand R, Montag D, Schwab ME, Schachner M (1995) *Neuron* 15: 1375-1381.

Boguski MS, McCormick F (1993) *Nature* 366: 643-654.

Carlezon WA, Boundy VA, Haile CM, Lane SB, Kalb RG, Neve RL, Nester E J (1997) *Science* 277: 812-814.

Caroni P, Schwab ME (1988) *J. Cell Biol.* 106: 1281-1288.

Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC (1997) *Science* 275: 838-841.

Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS (1995) *Cell* 81: 1137-1146.

David S, Aguayo AG (1981) *Science* 214: 931-933.

Davies SJA, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997) *Nature* 390: 680-683.

Fan J, Mansfield SG, Redmond T, Gordon-Weeks PR, Raper JA (1993) *J Cell Biol* 121: 867-878.

Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM (1995) *Nature* 376: 509-514.

【 0 0 6 2 】

Hall A (1990) *Science* 249: 635-640.

Hall A (1994) *Annu Rev Cell Biol* 10: 31-54.

He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2509-2514.

Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC (1993) *Science* 259: 77-79.

Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA, Kocsis JD (1998) *J Neurosci* in press.

Inagaki S, Furuyama T, Iwahashi Y (1995) *FEBS Lett* 370: 269-272.

Jalink K, Moolenaar WH (1992) *J Cell Biol* 118: 411-419.

Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH (1994) *J Cell Biol* 126: 801-810.

Jin Z, Strittmatter, SM (1997) *J Neurosci* 17: 6256-6263.

Kimura K, Ito M, Amano M, Chicharo K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Naano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) *Science* 273: 245-248.

Kindt RM, Lander AD (1995) *Neuron* 15: 79-88.

Kolodkin AL, Matthes DJ, O'Connor TP, Patel NH, Admon A, Bentley D, Goodman CS (1992) *Neuron* 9: 831-845.

Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS (1993) *Cell* 75: 1389-1399.

Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17: 1201-1211.

【 0 0 6 3 】

Li Y, Field PM, Raisman G (1997) *Science* 277: 2000-2002.

Luo L, Hensch TK, Ackerman L, Barbel S, Jan LY, Jan YN (1996) *Nature* 379: 837-840.

Luo L, Liao YJ, Jan LY, Jan YN (1994) *Genes and Dev* 8: 1787-1802.

Luo Y, Raible D, Raper JA (1993) *Cell* 75: 217-227.

Luo Y, Shepherd I, Li J, Renzi MJ, Chang S, Raper JA (1995) *Neuron* 14: 1131-1140.

Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao Z, Lim L (1994) *Nature* 367: 40-46.

Massie B, Dionne J, Lamarche N, Fleurent J, Langlier Y (1995) *Biotechnology* 13: 602-608.

Matthes DJ, Sink H, Kolodkin AL, Goodman CS (1995) *Cell* 81: 631-639.

McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994) *Neuron* 13: 805-811.

Messersmith EK, Leonardo ED, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL (1995) *Neuron* 14: 949-959.

Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M (1995) *Cell* 81: 1147-1157
 Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT (1994) *Neuron* 13: 757-767.

Neve RL, Howe JR, Hong S, Kalb RG (1997) *Neuroscience* 79: 435-444.

Nobes CD, Hall A (1995) *Cell* 81: 53-62.

Puschel AW, Adams RH, Betz H (1995) *Neuron* 14: 941-948.

Raper JA, Kapfhammer P (1990) *Neuron* 2: 21-29.

【0064】

Schafer M, Fruttinger M, Montag D, Schachner M, Martini R (1996) *Neuron* 16: 1107-1113.

Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde Y, Schwab ME (1994) *Nature* 367: 170-173.

Strittmatter SM (1995) *The Neuroscientist* 1: 255-258.

Strittmatter SM (1996) *The Neuroscientist* 2: 83-86.

Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC (1990) *Nature* 344: 836-841.

Strittmatter SM, Cannon SC, Ross EM, Higashijima T, Fishman MC (1993) *Proc Natl Acad Sci, USA* 90: 5327-5331.

Strittmatter SM, Igarashi M, Fishman MC (1994a) *J Neurosci* 14: 5501-5513.

Strittmatter SM, Fishman MC, Zhu X-P (1994a) *J Neurosci* 14: 2327-2338.

Strittmatter SM, Frankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC (1995) *Cell* 80: 445-452.

Wang LH, Strittmatter SM (1996) *J Neurosci* 16: 6197-6207.

ここに引用された文献は参考として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1Aはコブラシン(collapsin)-1誘発成長円錐(コーン)崩壊(コラプ

ス) がK T 5 9 2 6 によって減衰されることを図解するグラフである。

【図1 B】

図1 Bはコブラシン-1 誘発成長円錐崩壊がP T Xによって減衰されることを図解するグラフである。星印はオリゴマーBフラクションが影響をもたなかったにもかかわらず、P T Xが2 0 0 p Mコブラシン-1 で成長円錐崩壊を著しく減少させたことを示す。

【図2 A】

図2 Aはr h oサブファミリータンパクで摩砕（又は粉碎）されたD R Gニューロン中の成長円錐崩壊及び神経突起成長（又はニューライト発芽後成長）を示す。粉碎に用いたタンパク調剤をS D S-P A G Eで分離し、クマシーブルーで染色した。4 5、3 6、2 5及び2 1 k D aのM r基準の移動を右側に示す。

【図2 B】

図2 Bはr h oファミリータンパクで粉碎したD R Gニューロン中の成長円錐崩壊を示すグラフである。D R Gニューロンをr h oファミリータンパクの5 m g / m L及びC 3トランスフェラーゼの0. 1 m g / m Lの量で所定のタンパクで粉碎した。培養4時間後、成長円錐崩壊を2 0 0 p Mコブラシン-H i s eに2 0分間さらして（灰色の棒）、又はさらさないで（濃色の棒）評価した。星印で示す値は同一の条件下でのバッファー粉碎細胞と著しく異なることを示す。

【図2 C】

D R Gニューロンを所定のタンパクで粉碎し、図2 Bで記載した如くコブラシン-1にさらし、アクチンをT R I T C-ファロイジンでホルマリン固定細胞を染色することによって視覚化した顕微鏡写真である。5 0 0倍の拡大写真である。

【図2 D】

図2 Dは、D R Gニューロンをr h oファミリータンパクの5 m g / m L及びC 3トランスフェラーゼの0. 1 m g / m Lの量で所定のタンパクで粉碎し、培養2時間後、ニューロンをさらに3時間コブラシン-H i s eの0 p M（濃色の棒）又は2 0 0 p M（灰色の棒）にさらし、次いで細胞ごとに平均全神経突起成長（ニューライト発芽後成長）を決定し、その結果を示すグラフである。星印で

示す値は同一の条件下でのバッファー粉碎細胞と著しく異なることを示す。

【図3A】

図3AはN17racタンパクの各濃度で粉碎した後の成長円錐崩壊を200pMコラブシンにさらし(○)又はさらさないで(●)で決定した結果を示すグラフである。

【図3B】

図3Bは成長円錐運動性のコラブシン-1調節におけるrac1を示すグラフである。DRGニューロンを0又は2.5mg/mLのN17rac及び下記の構造的に活性なGタンパクの0又は5mg/mLで粉碎した。BはN17rac、CはN17rac+V14rho、DはN17rac+V12rac、EはN17rac+V12cdc42、そしてAはバッファーである。成長円錐崩壊を200pMコラブシン-1の非存在下(濃色の棒)又は存在下(灰色の棒)で決定した。V12racがコラブシン誘発成長円錐崩壊のN17racの阻害を部分的に逆転することを示している。

【図3C】

図3Cは、バッファー(●)、構造的に活性なV12rac(◇)又は優性ネガティブN17rac(◆)による粉碎後、成長円錐崩壊が所定の濃度のコラブシンにさらされたDRGニューロンについて計量された結果を示すグラフである。

【図4A】

図4AはDRGニューロンに関するC3トランスフェラーゼの活性を示すグラフである。C3トランスフェラーゼの所定の濃度をDRGニューロンの粉碎を介して存在させ、200pMコラブシン-1の存在下及び非存在下での成長円錐崩壊を図2における如く決定した。

【図4B】

図4BはDRGニューロンについてのC3トランスフェラーゼの活性を示すグラフである。バッファー、4μg/mLのC3トランスフェラーゼ、5mg/mLのV14rho、又は両タンパクによる粉碎ニューロンを0pM(灰色の棒)又は200pM(濃色の棒)コラブシン-His₆にさらし、成長円錐崩壊を定

量した結果を示す。Aはバッファーであり、BはC3であり、CはV14rhoであり、DはC3+V14rho、EはC3+V12racであり、そしてFはC3+V12cdc42である。

【図4C】

図4CはDRGニューロンについてのC3トランスフェラーゼの活性を示すグラフである。図4Cは、図4Bにおける如く粉碎された細胞ごとに平均全神経突起成長（ニューライト発芽後成長）を200pMコラブシン-His₆の存在下（灰色の棒）又は非存在下（濃色の棒）で培養した後に決定した結果を示す。Aはバッファーであり、BはC3であり、CはV14rhoであり、DはC3+V14rho、EはC3+V12racであり、そしてFはC3+V12cdc42である。

【図5A】

図5AはC3トランスフェラーゼの作用がN17racによってブロックされないことを示すグラフである。図5Aは、DRGニューロンをバッファー、5μg/mLのN17rac、0.1mg/mLの3Cトランスフェラーゼ又は両タンパクで粉碎し、ニューロンを4時間培養し、次いで成長円錐崩壊を20分間200pMコラブシン-His₆にさらし（灰色の棒）又はさらすことなく（濃色の棒）検定した結果を示す。

【図5B】

図5BはC3トランスフェラーゼの作用がN17racによってブロックされないことを示すグラフである。図5Bは所定のタンパクで粉碎したニューロンについて細胞ごとに平均全神経突起成長（ニューライト発芽後成長）を培養後4時間後に決定した結果を示す。

【図6A】

図6Aはミエリンによる成長円錐崩壊がN17racによってブロックされないことを示す。DRGニューロンを図に示す如く所定のタンパクで粉碎し、ニューロンを4時間培養し、そして成長円錐崩壊をバッファー（濃色の棒）又はCNSミエリン抽出物（5μgタンパク/mL、灰色の棒）に30分にさらした後に検定した結果を示す。

【図6B】

図6Bはミエリンによる成長円錐崩壊がN17racによってブロックされないことを示す図である。DRGニューロンを図に示す如く所定のタンパクで粉碎し、ニューロンを2時間培養後、さらに2時間CNSミエリン抽出物の0タンパク/mL（濃色の棒）又は5 μ gタンパク/mL（灰色の棒）にさらし、細胞ごとに平均全神経突起成長（ニューライ発芽後成長）を培養後4時間に決定し、その結果を示す。

【図6C】

図6CはLPAによる成長円錐崩壊がN17racによってブロックされないことを示す図である。DRGニューロンを図に示す如く所定のタンパクで粉碎し、ニューロンを4時間培養し、そして成長円錐崩壊をバッファー（濃色の棒）又はLPA（1 μ M、灰色の棒）に30分間さらした後に検定した結果を示す。

【図7】

図7はDRG成長円錐機能のrho/rac調節についてのモデル図を示し、DRG成長円錐について三つの状態を形態学的に外観、神経突起速度（発芽後成長速度）、rho活性化状態及びrac1活性化状態によってクラス分けしたものである。

【図8】

図8はタウ（tau）EGEPと共にC3細胞外酵素（エキソ酵素）又はrac1の発現のための主要素を説明するアデノウイルス転位ベクターマップを図解する。

【図9】

図9はrac1変異体のアデノウイルスについての発現の免疫プロットを示す。COS-7細胞を野性型rac1（レーン1）、V12rac1（レーン2）、N17rac1（レーン3）又は非rac1タンパク（レーン4）を発現する組換えアデノウイルスによって感染させ、感染後24時間後の細胞分析はrac1の低い内生的レベルが組換えアデノウイルスによって著しく増加されることを示す。

【図10A】

図10AはC3細胞外酵素のアデノウイルスについての発現を組織学的に示す。COS-7細胞をGFP（コントロール）を発現する組換えアデノウイルスで感染させ、感染後1日目に細胞を固定し、アクチンフィラメントをロダミン-パロイジン染色によって視覚化した。C3-発現細胞の変化した構造が見られる。細胞の95%以上が培養中に感染された。

【図10B】

図10BはC3細胞外酵素のアデノウイルスについての発現を組織学的に示す。COS-7細胞をC3+GFPを発現する組換えアデノウイルスで感染させ、感染後1日目に細胞を固定し、アクチンフィラメントをロダミン-パロイジン染色によって視覚化した。C3-発現細胞の変化した構造が見られる。細胞の95%以上が培養中に感染された。

【図11A】

図11AはDRGニューロン培養をC3/GFPで感染させ、次いで4日間培養した後、ニューロン表現型によって細胞中にマーカータンパクの発現を示す蛍光顕微鏡写真である。

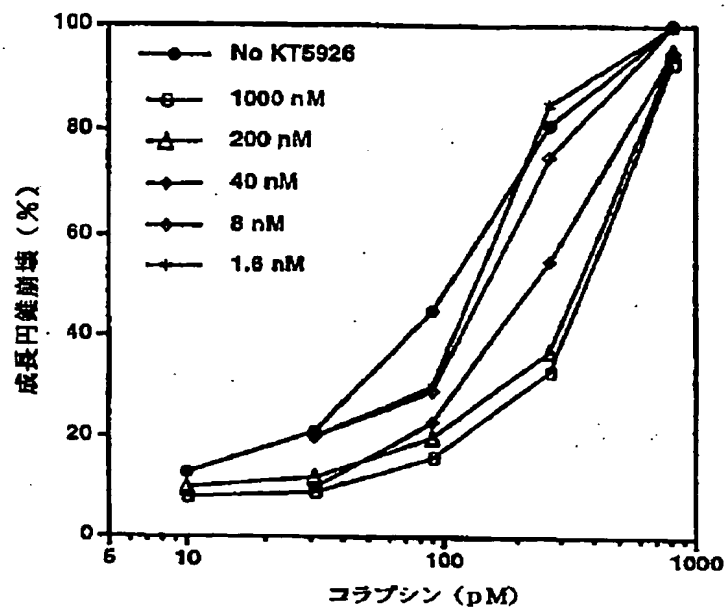
【図11B】

図11Bは組換えアデノウイルス発現C3が神経突起成長（ニューライト発芽後成長）のミエリン誘発阻害を防止することを示す。DRGニューロン培養をC3/GFPで感染させ、次いで4日間培養した後、細胞をトリプシン化し、そして添加せずに、コラプシン-1で又はCNSミエリンの抽出物で置き換えた結果を示す。神経突起成長（ニューライト発芽後成長）はこれらの阻害因子の添加によって減少しないことを示す。

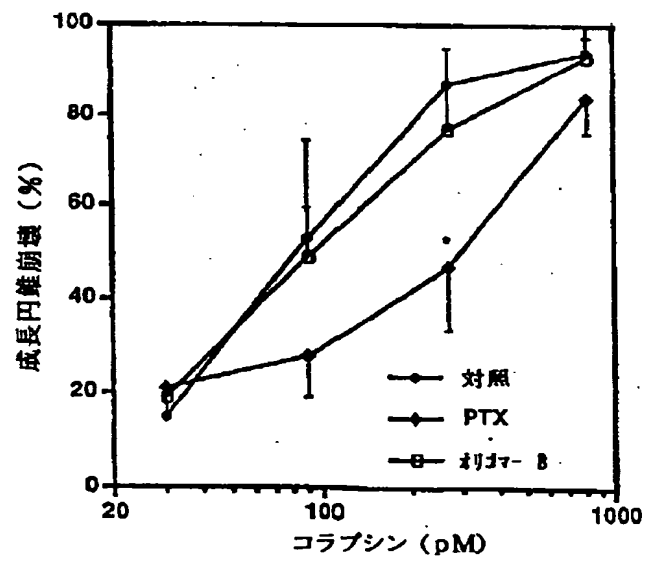
【図12】

図12はC3/EGFPアデノウイルスを8週齢のラットの大脳皮質に注入した後、数日後にラットを殺し、脳を蛍光顕微鏡で視覚化した顕微鏡写真である。

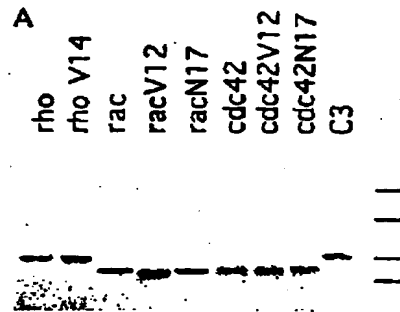
【図1A】



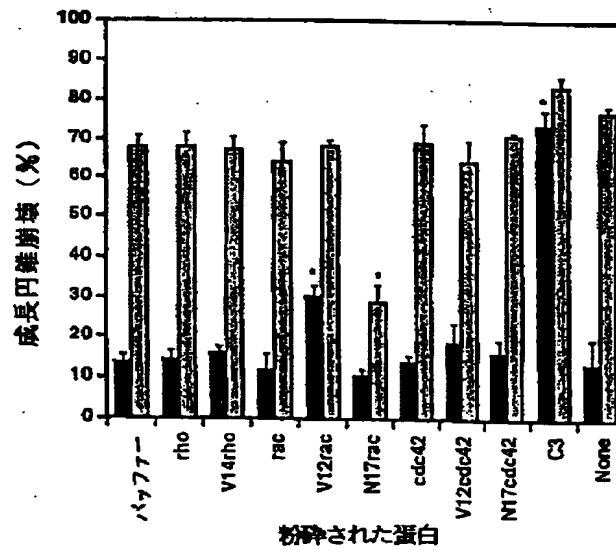
【図1B】



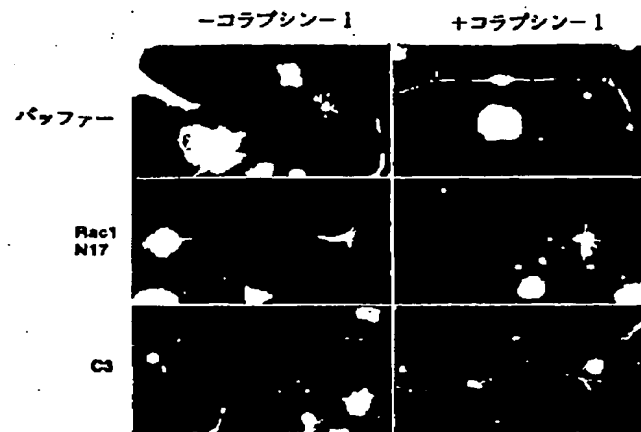
【図 2 A】



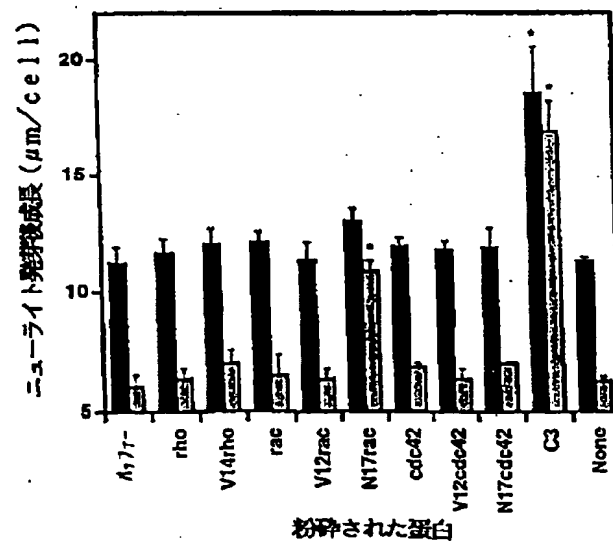
【図 2 B】



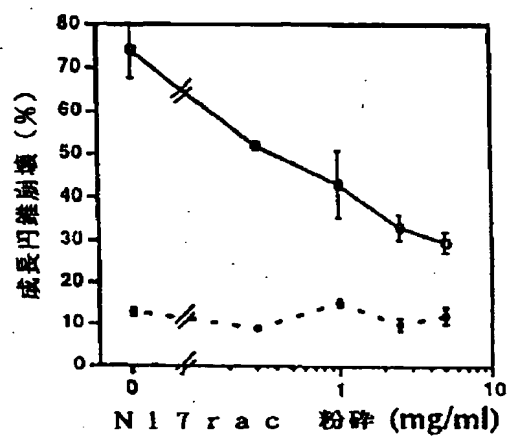
【図2C】



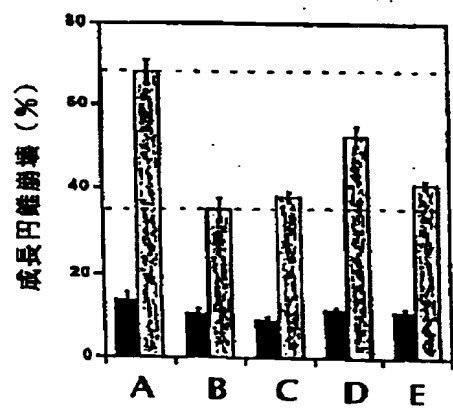
【図2D】



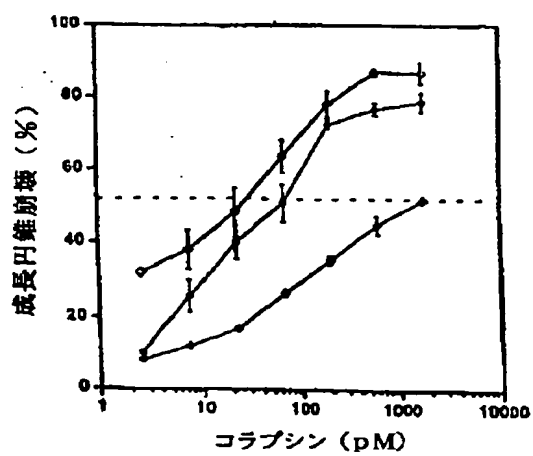
【図3A】



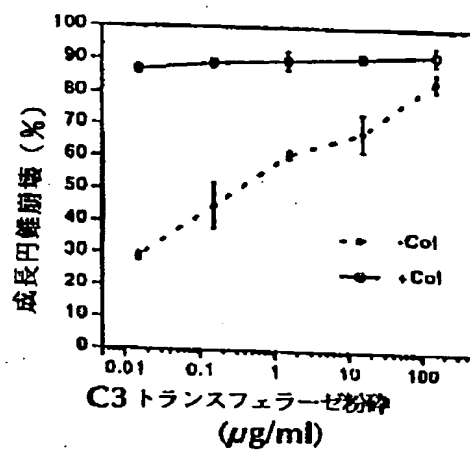
【図3B】



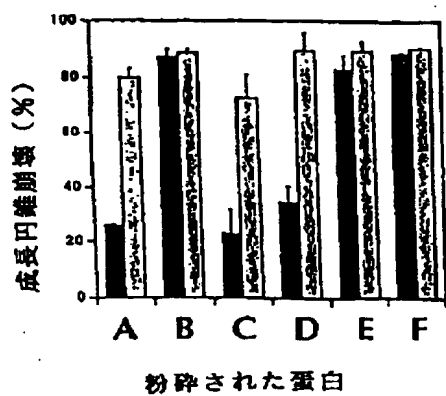
【図 3 C】



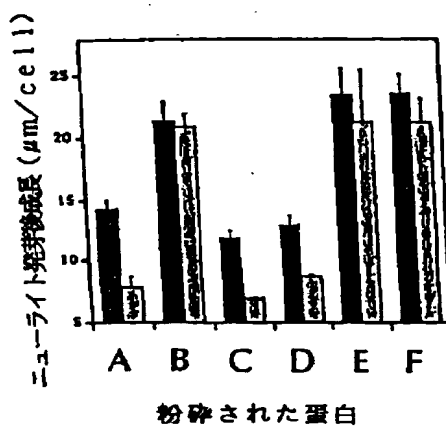
【図 4 A】



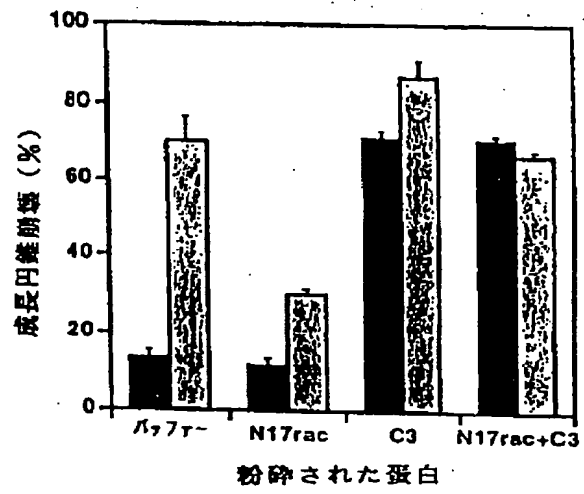
【図4B】



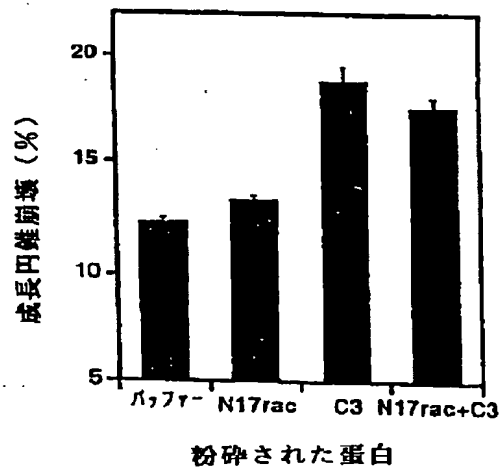
【図4C】



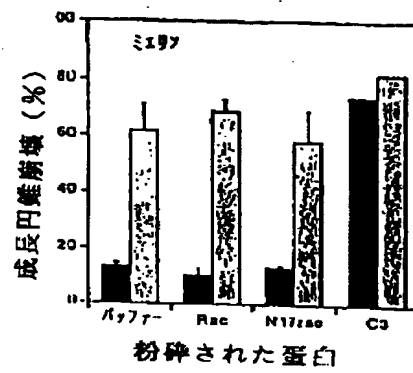
【図5A】



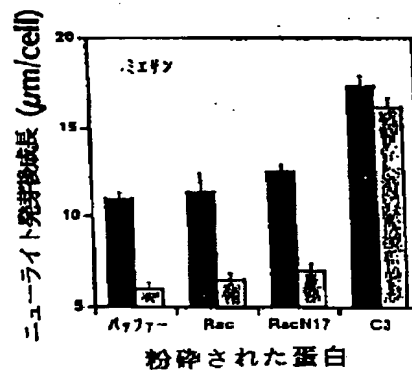
【図5B】



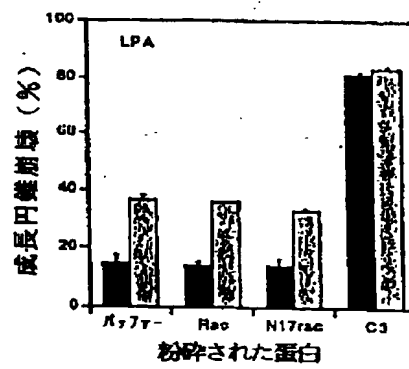
【図 6 A】



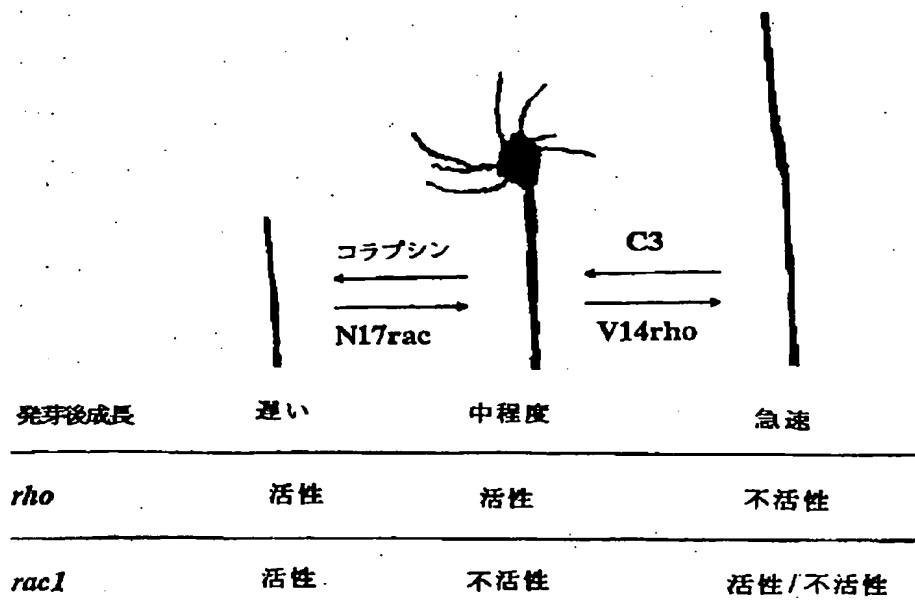
【図 6 B】



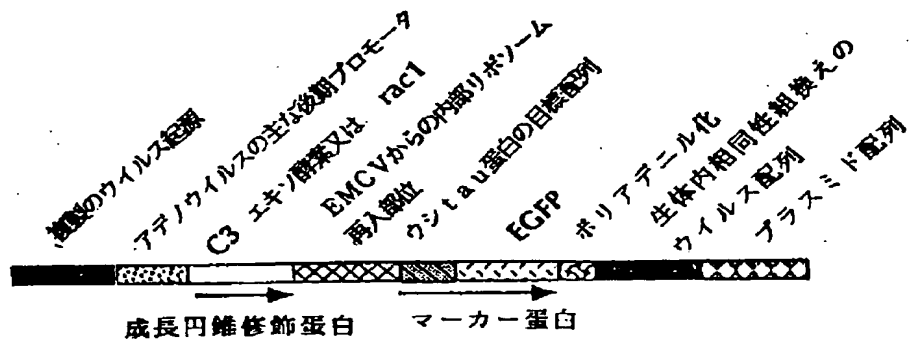
【図 6 C】



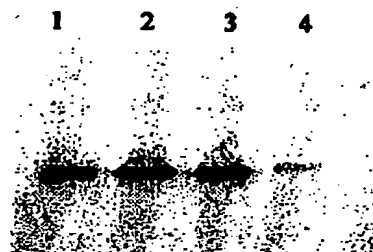
【図7】



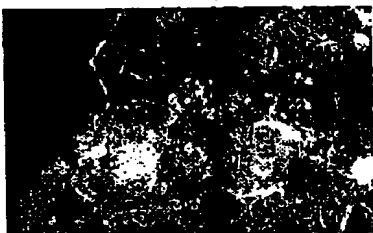
【図8】



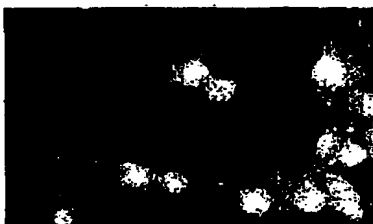
【図9】



【図10A】



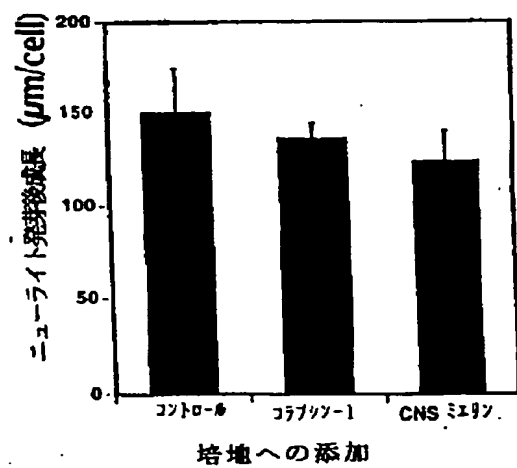
【図10B】



【図11A】



【図11B】



【図12】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/16794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : A01N 63/00; C12N 15/64, 500; A61K 38/00; A01N 43/04 US CL : 424/93.21; 435/91.4, 325; 514/2, 44 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.21; 435/91.4, 325; 514/2, 44 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched None Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CAS ONLINE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NISHIKI ET AL. ADP-Ribosylation of the rho/rac Proteins induces growths inhibition, neurite outgrowth and Acetylcholine Esterase in Cultured PC-12 Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 28 February 1990, Vol. 167, No. 1, pages 265-272, especially pages 270 and 271.	1-20
A	LUO ET AL. Rho family small GTP-binding proteins in growth cone signalling. Current Opinion in Neurobiology. 1997, Vol. 7, pages 81-86, especially pages 83 and 84.	1-20
A	NIKOLIC ET AL. The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. Nature. 10 September 1998, Vol. 395, pages 194-198, especially page 195.	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 NOVEMBER 1998		Date of mailing of the international search report 23 DEC 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DAVE NGUYEN Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/J898/16794

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	ZIPKIN ET AL. Role of a New Rho Family Member in Cell Migration and Axon Guidance in <i>C. elegans</i> . <i>Cell</i> . 05 September 1997, Vol. 90, pages 883-894, especially page 891.	1-20
Y	LUO ET AL. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: <i>Drosophila</i> Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. <i>Genes & Development</i> . 1994, Vol. 8, pages 1787-1802, especially page 1799, column 1.	1-20
Y	JALINK ET AL. Inhibition of Lysophosphatidate- and thrombin-induced Neurite Retraction and Neuronal Cell Rounding by ADP Ribosylation of the Small GTP-binding Protein Rho. <i>The Journal of Cell Biology</i> . August 1994, Vol. 126, No. 3, pages 801-810, especially page 809.	1-20
Y	US 5,543,498 A (FISHMAN et al) 06 August 1996, columns 3-6, especially column 4.	1-20
A,P	US 5,672,344 A (KELLEY et al) 30 September 1997, column 5.	1-20
Y	US 5,645,829 A (SHOCKLEY et al) 08 July 1997, columns 6-18, especially columns 7-8.	1-20
Y,P	US 5,661,033 A (HO et al) 26 August 1997, columns 8-12, especially column 11.	1-20

THIS PAGE BLANK (USPTO)